

Platelets and coagulation

Citation for published version (APA):

Swieringa, F. (2016). *Platelets and coagulation: partners in haemostasis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. <https://doi.org/10.26481/dis.20160331fs>

Document status and date:

Published: 01/01/2016

DOI:

[10.26481/dis.20160331fs](https://doi.org/10.26481/dis.20160331fs)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Platelets and coagulation: partners in haemostasis

Haemostasis is the process that ensures cessation of blood flow after tissue injury. It relies on the activation of both platelets and the coagulation cascade, and results in the formation of a platelet-fibrin thrombus or clot. Functional defects in these processes can lead to a decreased thrombus/clot forming potential and bleeding. The contribution of platelets to haemostasis is not limited to their adhesive and cohesive functions, but extends to their ability to stimulate the coagulation process. Exposed phosphatidylserine on the surface of activated platelets acts as a site for the assembly of coagulation factors, which catalyse several proteolytic steps in the coagulation cascade, in particular causing activation of factor X into factor Xa and prothrombin into thrombin. The studies in this thesis were performed to identify novel links between platelet activation and the formation and breakdown of a fibrin clot. **Chapter 1** provides a brief, general background on the known mechanisms of platelet activation and coagulation activity in thrombus formation. Highlighted here are key platelet receptors in clot formation; the use of proteomics to identify the roles of platelet protein kinases; the regulation of thrombin generation, fibrin formation and fibrinolysis; and description of the multiple interactions of platelets and coagulation in thrombus formation.

Presuming that the process of thrombus formation, as assessed by whole blood flow experiments and experimental thrombosis studies, adequately reflects the platelet responses in haemostasis, in **Chapter 2** an extended overview is given on the main platelet receptors and downstream signalling pathways that are implicated in haemostasis. In addition, potential therapeutic targets are discussed of these platelet activation pathways. Currently, the main receptors with potential or established clinical relevance are those of thrombin, thromboxane A₂, ADP, ATP, prostaglandins, von Willebrand factor (VWF), collagen, CLEC-2 ligand, fibrinogen and laminin. Dysfunction of one or more of these platelet activation pathways, which can be either inherited or acquired due to antiplatelet medication, may lead to a higher risk of bleeding. Only mild bleeding complications are reported in case of deficiency in the collagen receptor glycoprotein VI, making this signalling pathway an interesting target for antithrombotic therapy. It is also described that, for proper diagnosis and treatment, uniformity is needed in the registration of bleeding events, e.g. by using standardised assessment tools and platelet function tests.

In **Chapter 3** sensitive (phospho)proteomics approaches are used as a novel fascinating technique to study platelet function defects. In patients with *Albright hereditary osteodystrophy* (AHO), linked to a heterozygous mutation in the *GNAS1* gene cluster, a hypofunction exists of the GTP-bound Gs α protein, resulting in impaired signalling via adenylate cyclase (AC) and cAMP-dependent protein kinase A (PKA). The Gs α protein is activated by the IP receptor for prostacyclin and iloprost. By using highly sensitive quantitative techniques, changes in protein abundance and protein phosphorylation pattern were assessed in platelets from a well-identified

AHO patient. While the global proteome was not different from that of healthy controls, phosphoproteomic analysis revealed 180 altered protein phosphorylation sites along the Gs α -AC-PKA axis in AHO platelets stimulated with iloprost. These 180 phosphorylation events were particularly found in protein targets downstream of PKA; approximately 50 % of these were novel phosphorylation sites that have not been described before. The altered, decreased, phosphorylation state in AHO platelets reflects the impaired ability of iloprost to inhibit platelet responses, such as aggregation, secretion and thrombus formation.

Thrombus formation at high shear rate is initiated by platelet adhesion to VWF bound to collagen fibres via the receptor complex, glycoprotein Ib-V-IX. In **Chapter 4**, we supposed that cardiothoracic patients who suffer from postoperative bleeding complications due to haemodilution benefit from desmopressin treatment due to do novo release of VWF from the endothelium. We found that the plasma levels of VWF were already high in these patients pretreatment, but that desmopressin further increased the levels in particular of the active, high molecular weight VWF multimers. This increase in large VWF multimers resulted in an improved platelet deposition and thrombus formation on collagen under flow, as well as in enhanced platelet procoagulant activity (phosphatidylserine exposure). No major effect of desmopressin was found on the coagulant state of plasma, as determined by thrombin generation and thromboelastometry measurements. The results suggest that an increased VWF-dependent platelet activity can help to restore haemostasis in these bleeding patients.

With fibrinogen as a main ligand, integrin $\alpha_{IIB}\beta_3$ plays an important role in the development of platelet procoagulant activity, in addition to its classical role in platelet aggregate formation. In **Chapter 5** we identified an $\alpha_{IIB}\beta_3$ outside-in signalling pathway that stimulates the late phase of the Ca²⁺ responses in platelets, thereby increasing phosphatidylserine exposure and enforcing tissue factor-triggered thrombin generation on platelets. In agreement with inhibitor studies, we found that platelets from patients with Glanzmann's thrombasthenia, lacking $\alpha_{IIB}\beta_3$, possessed a reduced procoagulant potential. Analysis of the protein tyrosine phosphorylation pattern pointed to a key role of the kinase Syk, which was largely but not exclusively dependent on $\alpha_{IIB}\beta_3$ activation.

In **Chapter 6** we developed and employed an integrative whole blood flow method, allowing the combined assessment of platelet and coagulant functions. This allowed us to assess the formation and composition of fibrin clots on various thrombogenic surfaces consisting of collagen and tissue factor. Lowering the collagen content reduced platelet deposition and fibrin formation, which effects were compensated by a larger thrombus size and an increased accumulation of fibrin in the luminal regions of the thrombi. At low collagen, the formation of thrombi was more dependent on the local generation of thrombin. In addition, we used a novel nano-indentation technique, to assess the mechanical properties - i.e. the microelasticity - of thrombi formed on these physiological surfaces. We observed that the redistribution of fibrin

from the base to the luminal region of a thrombus was accompanied by an increased microelasticity. This redistribution was also observed with thrombocytopenic blood, where not the collagen content on the surface but the platelet count is a limiting factor in fibrin clot formation. These findings demonstrated that, under conditions of flow and coagulation, the amount and localisation of fibrin are dependent on the relative abundance of the triggers for platelet adhesion (collagen) and coagulation (tissue factor). Furthermore, the microelasticity of a thrombus appears to be dependent on the fibrin distribution in the thrombus.

In **Chapter 7** we assessed how the intrinsic coagulation pathway to tenase activation contributes to the formation of platelet-fibrin thrombi under flow. While there is strong experimental evidence that phosphatidylserine-exposing platelets in a thrombus support prothrombinase activity, the exact mechanism how factor X activation on a thrombus is regulated is much less understood. We found that activated factor IX and X are located on phosphatidylserine-exposing positive platelets in a thrombus, whereas factor VIII co-localises with VWF, which in turn is bound to collagen and fibrin fibres. The results point to a mechanism of delivery of VWF-bound factor VIII to phosphatidylserine-exposing platelets, resulting in transient formation of the tenase complex, which then serves to enhance thrombus formation. Perfusion experiments with human and mouse blood with deficiencies in factor VIII or IX indicated a limiting role for both factors in the factor Xa-mediated stimulation of platelet procoagulant activity via thrombin generation and subsequent fibrin formation. Whereas haemophilia A and B are often considered as similar pathologies, our data indicated that the formation of platelet-fibrin thrombi was less reduced with factor IX-deficient blood than with factor VIII-deficient blood. This might explain the lesser bleeding complications in patients with factor IX deficiency.

Additionally to controlling thrombus and fibrin formation, platelets can also play a role in fibrinolysis as they secrete the fibrinolytic factor plasminogen from their α -granules. In **Chapter 8**, we investigated how a platelet-fibrin thrombus is lysed under flow conditions, with particular focus on the role of plasminogen. High-resolution microscopy indicated that plasminogen is localised on 'caps' protruding from phosphatidylserine-exposing platelets. The binding of plasminogen relies on integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and fibrin(ogen), as blocking of either $\alpha_{IIb}\beta_3$ or fibrin polymerisation attenuated this interaction. In thrombi formed by whole blood perfusion plasminogen primarily bound to platelet-associated fibrin, with a smaller pool directly binding to platelets. Degradation of fibrin in the thrombi was dose-dependently induced by tissue and urokinase plasminogen activator (tPA/uPA), and was promoted by three distinct factors, namely by: incorporation of tPA/uPA into the growing thrombus, inhibition of (thrombin and) fibrin formation, and increasing the flow rate.

The final **Chapter 9** discusses the key findings of this thesis in the light of relevant literature. New insights into the underlying mechanisms of thrombus formation reveal intricate interactions between platelet activation and coagulant activity, and help to better understand bleeding complications in patients in various clinical settings.

Samenvatting

Plaatjes en stolling: partners in hemostase

Hemostase is het proces dat zorgt voor het stelpen van een bloeding, als gevolg van beschadiging van een bloedvat. Deze bloedstelping is afhankelijk van de activering van bloedplaatjes en de stollingscascade, en leidt tot de vorming van een plaatjes-fibrine trombus of stolsel. Functionele defecten in deze activeringsprocessen kunnen leiden tot een verminderde potentie om een stolsel te vormen met een mogelijke bloeding als gevolg. De bijdrage van bloedplaatjes aan hemostase is niet beperkt tot hun adhesieve en cohesieve eigenschappen, maar omvat ook hun vermogen om het stollingsproces sterk te stimuleren. Op geëxposeerd fosfatidylserine aanwezig op de buitenmembraan van geactiveerde bloedplaatjes hechten diverse stollingsfactoren, hetgeen leidt tot een katalyse van verschillende proteolytische stappen in de stollingscascade, in het bijzonder de activering van factor X naar factor Xa en van protrombine naar trombine. Echter er zijn vele aanwijzingen dat er ook andere interacties zijn tussen de activering van bloedplaatjes en de stollingscascade. De studies in dit proefschrift zijn uitgevoerd om nieuwe schakels tussen plaatjesactivering en de vorming en afbraak van een fibrine-stolsel te identificeren en op te helderen. **Hoofdstuk 1** biedt hiertoe een korte, algemene achtergrond over de tot dusver bekende mechanismen van plaatjesactivering en stollingsactiviteit bij de trombusvorming. Uitgelicht zijn hier de belangrijkste betrokken plaatjesreceptoren; het mogelijk gebruik van proteomics-technieken om de meest relevante eiwitten te identificeren; op hoofdlijnen de regulatie van trombinegeneratie, fibrinevorming en fibrinolyse; en de beschrijving van bekende interactie-mechanismen.

Gebaseerd op het concept dat het proces van trombusvorming, zoals dat plaatsvindt in volbloed perfusie-experimenten en *in vivo* trombosestudies in diermodellen, een adequaat inzicht biedt in de bloedplaatjes-reacties bij hemostase, biedt **Hoofdstuk 2** een uitgebreid overzicht van de belangrijkste receptoren en de bijbehorende signaleringspaden die betrokken zijn bij het proces van trombusvorming. Daarnaast worden potentiële therapeutische doeleiwitten in deze signaleringspaden besproken. Voor de kliniek zijn de belangrijkste receptoren met potentiële of bekende relevantie de receptoren voor trombine, tromboxaan A₂, ADP, ATP, prostaglandines, von Willebrand factor (VWF), collageen, CLEC-2 ligand, fibrinogeen en laminine. Dysfunctie van één of meer van deze receptoren of betrokken signaleringspaden, door oftewel een genetisch defect oftewel een verworven defect middels antiplaatjesmedicatie, kan leiden tot een verhoogd bloedingsrisico. Enkel milde bloedingscomplicaties zijn bekend in geval van een deficiëntie van de collageenreceptor glycoproteïne VI, hetgeen deze receptor tot een interessant doeleiwit maakt voor antitrombotische therapie. Ook is in dit hoofdstuk beschreven, dat voor een juiste diagnose en behandeling uniformiteit nodig is bij de registratie van bloedingsepisodes, alsmede het belang van gestandaardiseerde diagnostische instrumenten en gevalideerde plaatjesfunctietesten.

In **Hoofdstuk 3** is gebruik gemaakt van geavanceerde (fosfo)proteomics

technieken als een nieuwe, fascinerende methode om structurele en functiedefecten van bloedplaatjes te bestuderen. In patiënten met *Albright hereditary osteodystrophy* (AHO), gelinkt aan een heterozygote mutatie in het *GNAS1* gen-cluster, is er sprake van een hypofunctie van het GTP-gebonden eiwit G_{α} . Dit resulteert in een beperkte signalering via adenylaats cyclase (AC) en het cAMP-afhankelijke proteïne-kinase A (PKA). In bloedplaatjes wordt het G_{α} eiwit geactiveerd door de IP-receptor voor prostacycline en iloprost. Door gebruik te maken van zeer gevoelige kwantitatieve technieken, konden we de eiwit-patronen en fosforyleringsstatus bepalen in iloprost-behandelde bloedplaatjes van een goed gekarakteriseerde AHO patiënt. Hoewel het globale proteoom niet verschilde van dat van controle-bloedplaatjes, toonde de fosfoproteomics analyse aan dat er 180 fosforyleringsplaatsen in eiwitten veranderend waren in AHO plaatjes gestimuleerd met iloprost. Veranderde fosforylering vond voornamelijk plaats in potentiële PKA substraten (de signaleringsas G_{α} -AC-PKA). Ongeveer 50% van deze waren nieuw geïdentificeerde fosforyleringsplaatsen, die niet eerder in de literatuur beschreven zijn. De verminderde fosforyleringsstatus van AHO-plaatjes reflecteerde de verminderde capaciteit van iloprost om bloedplaatjesfuncties zoals aggregatie, secretie en trombusvorming te onderdrukken.

Trombusvorming bij een hoge stroomsnelheid van het bloed wordt geïnitieerd door de aanhechting van bloedplaatjes aan VWF dat bindt aan collageenvezels via het receptorcomplex glycoproteïne Ib-V-IX. In **Hoofdstuk 4** hebben we onderzocht of cardio-thoracale patiënten die lijden aan postoperatieve bloedingscomplicaties als gevolg van bloedverdunding, profiteren van behandeling met desmopressine door de vrijlating van VWF vanuit het endotheel. We vonden dat in deze patiënten de plasmaspiegels van VWF voor de behandeling reeds hoog waren, maar dat na desmopressine deze niveaus nog verder toenamen, met name van de meest actieve hoog molecuulgewicht multimeren van VWF. Deze toename in grote VWF-multimeren resulteerde in een verbeterde plaatjesdepositie en trombusvorming op collageen onder stromingscondities, en eveneens in een verhoogde stollingsactiviteit van bloedplaatjes (verhoogde fosfatidylserine-expositie). Daarentegen konden we geen effect vinden van desmopressine-behandeling op de stollingscapaciteit van het bloedplasma, zoals bepaald middels metingen van trombinegeneratie en tromboelastometrie. Deze resultaten suggereren dat een verhoogde VWF-afhankelijke plaatjesactiviteit kan bijdragen tot de herstelde hemostase in deze patiënten met postoperatieve bloedingen.

Met fibrinogeen als belangrijkste ligand, speelt integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ een rol in het ontstaan van procoagulante activiteit van bloedplaatjes, naast de klassieke rol in vorming van plaatjesaggregaten. In **Hoofdstuk 5** beschrijf ik de identificatie van een integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ -afhankelijk *outside-in* signaleringspad, dat bijdraagt tot de calciumrespons van bloedplaatjes, daarmee de fosfatidylserine-expositie verhoogt en de trombinegeneratie onder invloed van weefselfactor op deze bloedplaatjes versterkt. Zowel onder invloed van integrine-remmers als in bloedplaatjes van patiënten met Glanzmann's thrombasthenia (deficiëntie in $\alpha_{IIb}\beta_3$) maten wij een verminderde

procoagulante activiteit. Analyse van het tyrosine eiwitfosforyleringspatroon wees hierbij op een kern rol van Syk-kinase, welke grotendeels maar niet exclusief afhankelijk was van $\alpha_{IIb}\beta_3$ -activering.

In **Hoofdstuk 6** heb ik een integratieve volbloedmeting ontwikkeld en gebruikt, waarmee het mogelijk wordt tegelijkertijd de bijdrage van bloedplaatjes en bloedstolling te meten in de trombusvorming onder stromingscondities. Deze methode stelde ons in staat om de vorming en samenstelling te bepalen van plaatjes-fibrine trombi op verschillende trombogene oppervlakken, bestaande uit collageen en weefselfactor. Een lagere collageendichtheid leidde tot een verminderde plaatjesdepositie en fibrinevorming, hetgeen gecompenseerd werd door een toegenomen trombusgrootte en accumulatie van fibrine aan de bovenzijde van de trombus. Bij lage collageendichtheden werd de vorming van trombi bovendien meer afhankelijk van lokaal gegenereerd trombine. Daarnaast hebben we gebruik gemaakt van een nieuwe nanoindentatie-methode om beter inzicht te krijgen in de mechano-elastische eigenschappen (microelasticiteit) van trombi gevormd op deze fysiologische oppervlakken. We vonden dat een herverdeling van fibrine van de onderkant naar de bovenkant van trombi gepaard ging met een toegenomen microelasticiteit. Een dergelijke herverdeling werd ook gevonden met bloed van een patiënt met trombocytopenie, waarbij niet zozeer de collageendichtheid, maar het aantal bloedplaatjes de beperkende factor was in het trombusvormend proces. Deze bevindingen tonen dat onder stromingscondities in de aanwezigheid van stolling de hoeveelheid en lokalisatie van de fibrine afhankelijk zijn van de mate van zowel bloedplaatjesadhesie (collageen) als stimulering van de bloedstolling (weefselfactor). De microelasticiteit van een trombus blijkt hierbij bepaald te worden door de fibrine-distributie in de trombus.

In **Hoofdstuk 7** hebben we bekeken hoe de intrinsieke stollingscascade die leidt tot factor X activering bijdraagt aan de trombusvorming met depositie van plaatjes en fibrine trombi onder stromingscondities. Hoewel er sterke aanwijzingen waren dat de fosfatidylserine-exponerende bloedplaatjes in een trombus de activering van protrombine stimuleren, was het veel minder duidelijk hoe de activering van factor X gereguleerd is op een trombus. We vonden dat geactiveerd factor IX en X gelokaliseerd zijn op de fosfatidylserine-exponerende bloedplaatjes in een trombus, terwijl factor VIII co-lokaliseert met VWF, welke op zijn beurt gebonden is aan collageen- en fibrine-vezels. De resultaten wijzen op een mechanisme van aanvoer van VWF-geassocieerd factor VIII naar de fosfatidylserine-exponerende plaatjes, met als resultaat een tijdelijke vorming van het tenase-complex, dat vervolgens de trombusvorming verder bevordert. Perfusie-experimenten met humaan bloed en muizenbloed deficiënt in factor VIII of IX lieten zien dat er een beperkende rol is voor beide factoren in de activering van factor Xa op procoagulante activiteit van bloedplaatjes, en daaropvolgende trombinegeneratie en fibrinevorming. Hoewel hemofilie A en B vaak beschouwd worden als gelijksoortige aandoeningen, laten onze experimenten zien dat de trombusvorming met bloedplaatjes en fibrine sterker

beperkt werd met factor VIII-deficiënt bloed dan met factor IX-deficiënt bloed. Dit zou kunnen verklaren waarom factor IX deficiëntie overal het algemeen minder gepaard gaat met bloedingscomplicaties.

Aangezien bloedplaatjes de fibrinolysefactor plasminogeen uit hun α -granula kunnen uitscheiden, kan verwacht worden dat zij ook een rol spelen bij de fibrinolyse, dat wil zeggen het oplossen van een fibrine-stolsel. In **Hoofdstuk 8** onderzochten we hoe een plaatjes-fibrine trombus gelyseerd kan worden onder stromingscondities, met speciale aandacht daarbij voor de rol van plasminogeen. Microscopische beelden van geïsoleerde bloedplaatjes, opgenomen bij zeer hoge resolutie wezen uit dat plasminogeen voornamelijk gelokaliseerd is op zogenoemde ‘caps’, die te vinden zijn op fosfatidylserine-exposerende plaatjes. De binding van plasminogeen is afhankelijk van integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ en fibrine (of fibrinogeen), aangezien het blokkeren van óf $\alpha_{IIb}\beta_3$ óf fibrine-polymerisatie deze interactie tegengaat. In trombi gevormd tijdens stroming van volbloed onder stollingscondities was plasminogeen voornamelijk te vinden op plaatjes-gebonden fibrine, terwijl slechts een klein deel direct bond aan (fosfatidylserine-exposerende) bloedplaatjes. Degradatie van fibrine in de trombi gebeurde dosis-afhankelijk door tissue-type en urokinase-type plasminogeen activator (tPA en uPA), en werd bevorderd door drie processen, namelijk: incorporatie van tPA/uPA in een groeiende trombus, inhibitie van (trombine- en) fibrine-vorming, en verhogen van de stromingssnelheid.

Het afsluitende **Hoofdstuk 9** bespreekt de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift in het licht van huidige relevante literatuur. Nieuwe inzichten in de moleculaire mechanismen van trombusvorming, zoals in dit proefschrift, wijzen op onverwacht complexe interacties tussen bloedplaatjes en het stollingssysteem. Verder ophelderen van deze interacties is van belang om bloedingscomplicaties bij verschillende groepen patiënten beter te kunnen begrijpen en behandelen.

